

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山本軍次

---

雌性生殖をおこなう3倍体のフナが日本列島全域に広く分布することが知られている。最近ではこれらをギンプナ *Carassius auratus langsdorffii* と呼ぶようになりつつあるが、このフナの実態はまだよく分かっていない。雌と雄が存在する(つまり性が存在する)のが通常である脊椎動物の中にあつて、通常すべてが雌であるこのギンプナはユニークな存在であり、その起源と維持機構を明らかにすることは、性の存在理由という基本的な生物学的問題を解く手がかりを提供することにつながる。本論文は、そのような展望のもとに、日本産フナの雌性生殖系統の進化的起源の解明を目的にして、分子集団遺伝学的解析および人為交配を通じた実験的解析を実施し、その結果を取りまとめたものである。

論文は5章からなっている。まず緒言で背景と課題を明らかにしたあと、第2章で、日本産フナ属魚類全体の分類と遺伝的・系統的関係との関連性について解析している。日本産フナ属魚類は現在、形態的特徴から2種に区分され、そのうちの1種に5つの亜種があるとされており、雌性生殖をおこなうギンプナはそのうちの1亜種と位置づけられている。形態的に分類した日本産フナ属魚類全種(亜種)の標本を対象に、ミトコンドリアDNA(mtDNA)調節領域前半部 320 塩基対の塩基配列を分析し、そのデータから母系の類縁関係を調べた。試料となった標本の倍数性はフローサイトメリーないし血球サイズ測定によって判定した。その結果、全フナ属魚類は4つのサブグループに分かれ、ゲンゴロウブナ *C. cuvieri* の独自性は支持されたが、その他の日本産 *C. auratus* 各亜種は系統樹上でそれぞれ単系統にまとまらず、3倍体のギンプナも多系統となった(Templeton test,  $p < 0.001$ )。核ゲノムから見た遺伝的・系統関係を探るため、核ゲノム全域から広く遺伝的変異を抽出できる AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)法による分析を実施したところ、mtDNA 分析の結果と同様に日本産 *C. auratus* 各亜種は単系統にはまとまらないことが明らかになった。

そこで第3章では、従来の分類にとらわれず、全国 16 か所より2倍体と3倍体両方の *C. auratus* を採集し、mtDNA 塩基配列データ(各 320 塩基対)をもとに詳細な遺伝的比較をおこなった。467 個体を分析した結果、114 の塩基配列型が得られたが、16 地域のうち 12 か所(75%)で、同所的な2倍体と3倍体の間で塩基配列型の共有が認められた。同所的な2倍体と3倍体の間の遺伝距離は平均 0.017 であったのに対し、異所的3倍体間は平均 0.0288 で、後者の方が統計的にも有意に高い数値を示した。この結果は、全国に生息する3倍体フナは、3倍体同士よりも同所的に生息する2倍体に近縁であるという傾向があることを示している。これに基づき、3倍体フナが一度起源した後に分布を拡大したのではなく、むしろ多くの地域で2倍体有性生殖フナから派生したという見方が導かれることを論じている。

以上の結果に基づき、3倍体系統が今日でも新しく生じているという作業仮説を立て、この新たな考えを検証しようとしたのが第4章である。この仮説は、2倍体雌由来の非還元的2倍体卵が通常の半数体精子によって受精することにより3倍体系統が新たに生じているとするもので、人工授精によって生じる孵化仔魚の倍数性を逐一判定することによりその検証をおこなっている。実験は2産卵期にわたり実行された。2001年度は愛媛県重信川、長野県浦野川、および群馬県城沼産2倍体雌から卵を採取し、媒

精後、孵化まで発生を進めさせた。孵化した仔魚の倍数性はフローサイトメリーにより判定した。その結果、全ての採集地点で非還元2倍体卵に由来すると思われる仔魚が発生していることが明らかになった。そこで2002年度には、3倍体を生じる2倍体雌の割合や、一腹における3倍体仔魚の割合を明らかにするため、試料の採集地点を長野県諏訪湖に限定し、より規模の大きい実験を実施した。2倍体雌22個体から採卵し、同地の2倍体雄から採取した精子により媒精し、前年度と同様の手法にて一腹あたり50個体の仔魚の倍数性を調査した。その結果、2倍体雌22個体中15個体から非還元卵由来と考えられる3倍体仔魚が得られた。また一腹内の3倍体仔魚の比率は、ほとんどの親魚で10%以内であったが、20%近い親魚も確認された。以上の2期にわたる複数の地域での実験の結果、多くの2倍体親が頻度の差こそあれ3倍体の仔魚を産み出していること、そしてそれは一部地域のみではなく広く各地で起こっている現象であることを解明した。

以上の結果を踏まえて、第5章では総合的な考察を試みている。これまでに報告されてきた脊椎動物における雌性生殖系統は、異種間交雑にその起源があるとされている。今回の結果は、日本産フナにおいては、3倍体個体が直接の異種間交雑を経ずに各地の2倍体から独立に生じていることを明らかにしており、この知見は、脊椎動物における単為生殖系統の進化について新たな問題を提起することを指摘している。雌性生殖系統は全個体が雌からなるので、短期的には両性生殖の2倍の増殖率を示すが、遺伝的に均質なクローン体を形成するため、変動する環境下では長期に存続できないと考えられている。しかし、3倍体雌性生殖フナは全国に広く安定的に分布している。本研究が明らかにした2倍体から新たに生じた3倍体フナが成熟して雌性生殖をおこなうのであれば、フナの雌性生殖系統においては両性生殖集団から新たな系統が次々に加入してくることになるので、その結果、3倍体フナ集団が安定的に維持されている可能性のあることを論じている。

以上のように、本論文は、広範囲の採集に基づく規模の大きなDNA分析を行うとともに、そこから導き出されたユニークな仮説を実験的に検討して、フナにおいてはもとより脊椎動物全体においてもこれまでまったく知られていなかった新しい現象の存在を解明するという大きな成果を挙げている。この成果はさらに、他の脊椎動物においてこのような現象が本当に見られないのかどうか、非還元卵を産む生理学的・細胞学的機構はどのようなものか、そのような卵の産生割合を環境条件に応じて親が調節可能であるかどうか等、様々な興味深い課題を提起するもので、当該分野に重要な貢献をなすものと判断された。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文としてふさわしいものと認めた。